

**Quantifying multiple fluorochromes in a sample comprises mathematical analysis of fluorescence data spectrally resolved by using different excitation wavelengths**

**Publication number:** DE19915137  
**Publication date:** 2000-10-19  
**Inventor:** SCHAEFER MICHAEL (DE)  
**Applicant:** SCHAEFER MICHAEL (DE)  
**Classification:**  
- International: G01N21/64; G01N21/64; (IPC1-7): G01N21/64  
- European: G01N21/64F  
**Application number:** DE19991015137 19990326  
**Priority number(s):** DE19991015137 19990326

[Report a data error here](#)

**Abstract of DE19915137**

Quantifying multiple fluorochromes in a sample by recording and storing spectrally resolved fluorescence data for the fluorochromes in pure form and in the sample and determining the contributions from the pure fluorochromes to the complex total signals by multivariate linear regression analysis, spectral resolution by using different excitation wavelengths, is new.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) DE 199 15 137 A 1

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**G 01 N 21/64**

(21) Aktenzeichen: 199 15 137.7  
(22) Anmeldetag: 26. 3. 1999  
(43) Offenlegungstag: 19. 10. 2000

(71) Anmelder:  
Schäfer, Michael, 10551 Berlin, DE

(72) Erfinder:  
gleich Anmelder

(56) Entgegenhaltungen:  
DE 197 18 016 A1  
DE 195 33 092 A1  
DE 195 08 366 A1  
DE 69 218 53 6T2  
US 55 04 337 A  
US 47 91 310  
EP 02 94 524 A1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Verfahren zur Quantifizierung mehrerer Fluorochrome

(55) Das Verfahren zur Quantifizierung mehrerer Fluorochrome dient der quantitativen Erfassung des Beitrags verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zu einem Gesamtignal, das sich aus den Signalen mehrerer Fluorochrome zusammensetzt. Bei unzureichend durch optische Vorrichtungen abgrenzbaren Fluoreszenzeigenschaften stellt die Quantifizierung des Beitrags der Einzelkomponenten zu komplex zusammengesetzten Gesamtsignalen ein entscheidendes Problem unter anderem in der Fluoreszenzmikroskopie, der DNA-Sequenzierung oder der Werkstoffkunde dar. Diese Erfindung beschreibt ein neues Verfahren, das eine genaue Quantifizierung vieler Fluorochrome durch Aufzeichnung spektral aufgelöster Datensätze mit nachfolgender Regressionsanalyse erzielt. Das beschriebene Verfahren ist in der Lage, unter Erhalt von Bild- und Zeitauflösung den Beitrag verschiedener Fluoreszenzen zu einem komplexen Gesamtignal zurückzuverfolgen. Da keine nachfolgenden Kalibrationsprozeduren erforderlich sind, kann das Verfahren zur Echtzeitanalyse eines komplex zusammengesetzten Signals angewendet werden. Die Nutzung des beschriebenen Verfahrens wird durch Anwendungsbeispiele im Bereich der Fluoreszenzmikroskopie verdeutlicht.

DE 199 15 137 A 1

# DE 199 15 137 A 1

## Beschreibung

### Technisches Umfeld der Erfindung

- 5 Diese Erfindung bezieht sich auf die quantitative Fluoreszenzerfassung vorzugsweise in der Fluoreszenzmikroskopie bei simultaner Anwendung mehrerer Fluorochrome oder von Fluoreszenzindikatoren mit überlappenden spektralen Fluoreszenzeigenschaften.

### Stand der Technik

10 Die Quantifizierung einzelner Fluorochrome setzte bislang eine quantitative Trennbarkeit der Fluoreszenzsignale durch Wahl der Anregungs- und Emissionsbedingungen voraus. Bei Fluoreszenzindikatoren, deren Fluoreszenzen nicht durch entsprechende Anregungs- und Emissionskonfigurationen vollständig voneinander getrennt werden können, oder bei Fluorochromen mit stark überlappenden Anregungs- und Emissionscharakteristika können mit den bisherigen Verfahren nur Quantifizierungen zweier Fluorochrome mit überlappenden spektralen Eigenschaften erzielt werden. Zudem müssen zur Quantifizierung anschließend an den Meßvorgang Kalibrationsprozeduren durchgeführt werden oder mit Hilfe von Eichproben Referenzwerte für ein "Ratio-Verfahren" ausgezeichnet werden (stellvertretend für eine Vielzahl von Indikatorssystemen seien hier die  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatoren Fura-2 und Indo-1 genannt, siehe Patent US 4603209, Grynkiewicz et al. (1985)). Bei gleichzeitiger Anwesenheit weiterer Fluoreszenzen (z. B. "green fluorescent protein" (GFP) und dessen Varianten), die mit den spektralen Eigenschaften des Indikators überlappen, ist eine Quantifizierung über das in Patent US 4603209 und in Grynkiewicz et al. (1985) beschriebene "Ratio-Verfahren" nicht anwendbar.

15 Durch spezielle Kombinationen von Fluoreszenzfarbstoffen, Anregungslichtquellen, Anregungsfilttern, di- oder multichroische Spiegel und Emissionsfilter wurde die Anzahl simultan registrierbarer Fluorochrome ausgeweitet (Carlsson et al. (1994), Lowy (1995), Carlsson et al. (1998); Patente WO 9817992, WO 9418547 und WO 9723648). Diese Methoden leisten trotz optimierter optischer Vorrichtungen lediglich eine qualitative Aussage über die die Anwesenheit oder Abwesenheit von Fluorochromen in einem gegebenen Bildelement. Bei Anwendung multipler Fluorochrome beispielsweise in der Chromosomenanalyse (Ried et al. (1992); Patent WO 9723648) müssen Konfigurationen von Anregungsfilttern, dichroischen Spiegeln und Emissionsfiltern angewendet werden, die weniger als 10% Signalstreuung in Nachbarkanäle; garantieren. Eine Quantifizierung ist bei diesem Verfahren nicht vorgesehen, es können lediglich die Anwesenheit oder die Abwesenheit der entsprechenden Fluorochrome bestimmt werden.

20 Die Unterscheidung verschiedener Fluorochrome mit Hilfe der "fluorescence lifetime" Methode oder durch Amplitudenmodulation der Anregungslaser (Carlsson et al. (1998); Patente WO 9809154, US 5784157 beschrieben) ist zwar in der Lage, einige Fluorochrome anhand unterschiedlicher kinetischer Eigenschaften zu unterscheiden, doch sind die technischen Erfordernisse und die Kosten durch die Anwendung gepulster Lichtquellen und Detektorsysteme mit hoher Zeitauflösung enorm. Implementierungen des "fluorescencetime" Verfahrens für die Fluoreszenzmikroskopie (Oida et al. 25 (1993), Brismar und Ulshake (1997); Patent US 4791310), für die Durchflußzytometrie (Patente EP 0552241, WO 9207245, US 5270548 und US 5504337) und für die DNA-Sequenzierung (He et al. (1998)) wurden jedoch beschrieben. Viele Indikatorssysteme, die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden (beispielsweise Fura-2 vs. Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex, verschiedene Varianten des GFP), unterscheiden sich durch spektrale Veränderungen der Fluoreszenzcharakteristika, jedoch nicht bezüglich ihrer "fluorescence-lifetime"; daher ist die Anwendbarkeit der "fluorescence-lifetime" Verfahrens für solche Fluorochrome nicht gegeben.

25 Durch die vorhandenen Laserlichtquellen beschränkt sich die Auswahl der Anregungswellenlängen in konfokalen Lasermikroskopen auf wenige, verfügbare Laseremissionslinien. Hierbei kann oft nicht vermieden werden, daß Fluoreszenzen eines Fluorochroms in den Meßkanal eines anderen Fluorochroms mit einfließen. Unter solchen Bedingungen können viele Kombinationen von Fluorochromen und/oder Fluoreszenzindikatoren nicht eingesetzt werden. Bei diesen gemischten Meßsignalen können mit dem in dieser Erfindung beschriebenen Verfahren die Beiträge der in der Probe vorhandenen Fluorochrome zurückverfolgt werden. Zudem beeinträchtigt ein unterschiedlich schnelles Ausbleichen verschiedener Fluorochrome die quantitative Erfassung des Beitrags einzelner Fluoreszenzfarbstoffe zu einem zusammengesetzten Gesamtignal bei unvollständiger Trennbarkeit durch Anwendung optimierter optischer Vorrichtungen. Auch 30 diese Störgrößen können durch Anwendung des hier beschriebenen neuen Verfahrens eliminiert werden.

### Aufgabenstellungstellung

Das Ziel des in dieser Erfindung beschriebenen Verfahrens ist die quantitative Bestimmung der Beiträge verschiedener 35 Fluorochrome zu einem komplex zusammengesetzten Gesamtignal auch bei unvollständiger Trennbarkeit der Fluoreszenzeigenschaften mehrerer Fluorochrome und/oder Fluoreszenzindikatorsspezies durch alleinige Anwendung optischer Vorrichtungen.

### Erfindungsgemäße Lösung des technischen Problems

40 Die erfundungsgemäße Lösung der Aufgabenstellung setzt sich aus drei Arbeitsschritten zusammen, die zeitlich von einander trennen vorgenommen werden können:

- Aufzeichnung und Speicherung von spektral aufgetrennten Fluoreszenzsignalen der einzelnen Fluorochrome in Reinform.
- Aufzeichnung und Speicherung von spektral aufgetrennten Fluoreszenzsignalen der Probe, die eine unbekannte Mischung der Reinformen enthält.
- Mathematisches Regressionsverfahren zur Berechnung des Beitrags der einzelnen Reinformen zu dem komplexen Gesamtignal der Probe.

## Datenerfassung der spektral aufgetrennten Fluoreszenzen der Reinformen

Im ersten Schritt werden spektral aufgetrennte Fluoreszenzsignale der in einer Probe vorkommenden Fluorochrome in Reinform sowie das Hintergrundsignal ohne Fluorochrom im gegebenen optischen System aufgezeichnet. Die genannte spektrale Auftrennung wird entweder durch Änderung der Fluoreszenzanregungswellenlängen oder durch spektrale Selektion des in den Detektor gelangenden Fluoreszenzemissionslichts oder durch eine Kombination von beiden Maßnahmen erzielt. Die spektrale Aufzeichnung kann hierbei kontinuierlich beispielsweise mit Hilfe von Monochromatoren erfolgen oder diskontinuierlich gestaltet werden, beispielsweise durch diskrete Monochromatoreinstellungen, dichroische Spiegel, Filtersätze oder verschiedene Lichtquellen. Die spektral aufgelösten Datensätze werden nach Subtraktion des Hintergrundsignals in einer Datenbank zur späteren Verwendung gespeichert. Die gespeicherten, spektralen Datensätze der Reinformen können bei guter Reproduzierbarkeit in den Datenbanken verbleiben und für spätere Messungen wieder verwendet werden. Die spektral aufgetrennten Datensätze der Reinformen weiterer Fluorochrome können die Datenbank ergänzen und zu den bereits gespeicherten Datensätzen hinzugefügt werden. Die spektral aufgetrennten Datensätze der Reinformen auch bei mehr spektralen Konfigurationen aufgezeichnet werden, als es bei der Messung der Probe zunächst vorgesehen ist. Dies bietet den Vorteil, daß bei späterer Verwendung anderer spektraler Konfigurationen bereits Referenzdaten der Reinformen in der Datenbank existieren, und somit die Reinformfluoreszenzen nicht erneut aufgezeichnet werden müssen.

## Datenerfassung der Fluoreszenzen der Probe

Die Fluoreszenz der Probe setzt sich aus den Fluoreszenzen der genannten Reinformen zusammen. Eine spektrale Auftrennung der Fluoreszenzen der Probe wird in den spektralen und optischen Konfigurationen durchgeführt, in denen auch Daten der Reinformen aufgezeichnet wurden. Vornehmlich kommen solche spektrale Konfigurationen zum Einsatz, bei denen die Fluoreszenzen der in der Probe vorhandenen Reinformen die größten Differenzen untereinander aufweisen. Eventuell in der Probe vorhandene Autofluoreszenzen werden von den gewonnenen, spektral aufgetrennten Datensätzen subtrahiert.

Die Aufzeichnung der spektral getrennten Datensätze der Probe kann gegebenenfalls wiederholt werden um entweder dynamische Prozesse in der Probe zu verfolgen oder durch Mittelwertbildung die Streuung des Meßsignals zu verringern.

## Datenanalyse

Die gespeicherten Daten werden im folgenden Schritt mit Hilfe einer Regressionsanalyse ausgewertet. Hierbei können multivariate lineare Regressionsanalysen oder nichtlineare Regressionsanalysen zum Einsatz kommen. Im vorliegenden Anwendungsbeispiel wurden Auswertungen mit beiden Verfahren durchgeführt. Vor- und Nachteile der entsprechenden Verfahren werden erläutert. Durch die Regressionsanalyse können die relativen Beiträge der Reinformen zum Gesamtignal ermittelt werden und bei Kenntnis der Signalintensität bekannter Mengen des Fluorochroms auf die in der Probe vorhandene Menge des Fluorochroms geschlossen werden. Die hierzu erforderlichen Schritte werden in der Folge beschrieben:

Da CCD-Kameras bis zur Sättigungsschwelle weitgehend linear arbeiten, kann angenommen werden, daß sich unterhalb der Sättigungsschwelle bei jeder spektralen Konfiguration  $i$  das Gesamtignal einer Probe  $F_{ges}$  additiv aus den Signalanteilen der Einzelkomponenten  $1, 2, \dots, m$  zusammensetzt. Daher gilt  $F_{ges} = F_1 + F_2 + \dots + F_m$ . Diese Einzelkomponenten können als Produkt der durch Aufzeichnung und Normierung der Reinformfluoreszenzen bekannten, normierten Fluoreszenzintensitäten  $x_1, x_2, \dots, x_m$  mit den unbekannten Skalierungsfaktoren  $b_1, b_2, \dots, b_m$  ausgedrückt werden:  $F_m = b_m x_m$ . Während die normierten Fluoreszenzintensitäten  $x$  jeder der Einzelkomponenten bei unterschiedlichen spektralen Konfigurationen verschieden sind, bleiben die Skalierungsfaktoren  $b$ , die die in der Probe vorhandenen Stoffmengen der Fluorochrome anzeigen, konstant. Falls das für die Aufzeichnung eines spektralen Datensatzes benötigte Zeitintervall bei dynamischen Prozessen nicht vernachlässigbar gering ist, können sich Fehlerquellen ergeben; daher ist bei kinetischen Untersuchungen auf einen geschwindigkeitsoptimierten Ablauf der Datenerfassung zu achten.

Das Verfahren der Regressionsanalyse wird nun auf die Datensätze angewendet, um den Betrag der unbekannten Skalierungsfaktoren  $b_1 \dots b_m$  der jeweiligen normierten Intensität der Reinformen  $x_1 \dots x_m$  zum Gesamtignal  $y$  zu ermitteln. Bei jeder spektralen Konfiguration  $i$  setzt sich das Gesamtignal  $y_i$  aus den Signalen der im Bildelement befindlichen Reinformen  $F_{im}$  bzw.  $b_m x_{im}$  additiv zusammen.

Für jede Wellenlänge  $i$  gilt somit:

$$\text{Formel (1)} \quad y_i = b_1 x_{i1} + b_2 x_{i2} + b_3 x_{i3} + \dots + b_m x_{im}.$$

Die Anzahl der Reinformen  $m$  bestimmt die Zahl  $n$  der spektral unterschiedlichen Datensätze, die mindestens aufgezeichnet werden müssen, um eine Lösung mit Hilfe der Regressionsanalyse zu erzielen. Allgemein gilt also  $n \geq m$ .

Durch Aufzeichnen der  $n$  verschiedenen Datensätze ergeben sich aus den gemessenen spektral verschiedenen Datensätzen  $n$  verschiedene Lösungen eines linearen Gleichungssystems (LGS).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5 Formel (2):

$$\left\{ \begin{array}{l} y_1 = b_1 x_{11} + b_2 x_{12} + b_3 x_{13} + \dots + b_m x_{1m} \\ y_2 = b_1 x_{21} + b_2 x_{22} + b_3 x_{23} + \dots + b_m x_{2m} \\ \vdots \quad \vdots \quad \vdots \quad \vdots \\ y_n = b_1 x_{n1} + b_2 x_{n2} + b_3 x_{n3} + \dots + b_m x_{nm} \end{array} \right.$$

10

Dieses LGS kann bei der Aufzeichnung von  $m$  verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, deren spektrales Verhalten bekannt ist ( $x_{ij} \dots x_{nm}$  sind bekannt) bei  $n = m$  Wellenlängen direkt durch das Gauss-Jordan'sche Eliminationsverfahren gelöst werden, falls zwischen den  $n$  verschiedenen Lösungen keine lineare Abhängigkeiten bestehen. Die multivariate lineare Regressionsanalyse besitzt jedoch den Vorteil, daß mehr Meßwerte in die Berechnung aufgenommen werden können, und daß das Berechnungsverfahren zuverlässiger gestaltet werden kann.

15 Bei steigender Anzahl  $n$  erhöht sich die Zuverlässigkeit der Regressionsanalyse besonders bei nur schwach spektral unterschiedlichen Fluorochromen. Andererseits werden die Datensätze umfangreicher und die Datenanalyse verlangsamt. Bei der im Anwendungsbeispiel verwendeten CCD-Kamera mit 12 bit Auflösung werden beispielsweise bis zu  $1,3 \times 10^6$  Bildpunkte aufgezeichnet. Dies entspricht bei jeweils 10 verschiedenen spektralen Konfigurationen zu 20 Zeitintervallen einem Datensatz von 520 Megabyte.

20 Bei vektorieller Beschreibung einer multivariaten linearen Regressionsanalyse können die gesuchten Beträge der Reinformen in einem Lösungsvektor  $\bar{b}$  wie folgt ausgedrückt werden:  $\bar{b} = A^{-1} \times \bar{z}$ , wobei  $A^{-1}$  die inverse einer Matrix  $A$  ist. Der gesamte Term lautet:

25

Formel (3)

30

$$\begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ \vdots \\ b_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \sum x_{11}x_{11} & \sum x_{11}x_{12} & \sum x_{11}x_{13} & \dots & \sum x_{11}x_{im} \\ \sum x_{12}x_{11} & \sum x_{12}x_{12} & \sum x_{12}x_{13} & \dots & \sum x_{12}x_{im} \\ \sum x_{13}x_{11} & \sum x_{13}x_{12} & \sum x_{13}x_{13} & \dots & \sum x_{13}x_{im} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \sum x_{im}x_{11} & \sum x_{im}x_{12} & \sum x_{im}x_{13} & \dots & \sum x_{im}x_{im} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} \sum x_{11}y_1 \\ \sum x_{12}y_1 \\ \sum x_{13}y_1 \\ \vdots \\ \sum x_{im}y_1 \end{pmatrix}$$

35 Die Summen  $\Sigma$  werden hierbei über alle gemessenen spektralen Konfigurationen  $i = 1$  bis  $1 = n$  gebildet. Da die Matrix  $A$  quadratisch ist, kann die Inverse der Matrix  $A^{-1}$  durch das Gauß'sche Eliminationsverfahren mit Rücksubstitution gebildet werden. Bei hoher Komplexität der Matrix und bei schwach divergenten Datensätzen muß besonders auf Rundungsfehler geachtet werden, die sich teilweise dramatisch auswirken können. Die Computergestützte Ermittlung der inversen Matrix wurde daher im Anwendungsbeispiel mit doppelt genauen Fließkommavariablen durchgeführt. Im Zweifelsfall kann ein iteratives Verfahren zur Kontrolle und Verbesserung der Bildung der inversen Matrix dienen. Da die inverse Matrix für ein Meßprotokoll lediglich ein Mal berechnet werden muß, ist das aufwendige Verfahren der iterativen Kontrolle und Verbesserung empfehlenswert. Entsprechende Algorithmen mit Programmierungsrichtlinien sind der Fachliteratur zu entnehmen und im Internet publiziert.

40 Nach Kalkulation der inversen Matrix  $A^{-1}$  können mit Hilfe einiger Multiplikations- und Additionsschritte die Matrix  $A^{-1}$  mit dem Vektor  $\bar{z}$  zur Ermittlung des Lösungsvektors  $\bar{b}$  ausmultipliziert werden. In den Zeilen des Lösungsvektors sind die relativen Beiträge der einzelnen Fluorochrome zum jeweiligen Gesamtignal enthalten. Diese können bei homogener Ausleuchtung des Gesichtsfeldes über das gesamte Bildfeld als Maß für die lokale Menge des jeweiligen Fluorochroms dienen. Bei inhomogener Ausleuchtung können Korrekturfaktoren angewendet werden, die zuvor durch Messung einer normierten Fluorochromkonzentration in verschiedenen Bereichen des Gesichtsfeldes ermittelt wurden. Bei Fluoreszenzindikatoren, die abhängig von Milieubedingungen ihre Eigenschaften ändern (z. B. Fura-2 und Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex), ist zur Rückrechnung der entsprechenden Milieubedingung (lokale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration) keine Korrektur erforderlich, da Unterschiede in der Fluoreszenzintensität beide Indikatorformen gleichermaßen betreffen. So kann im Fall des Fluoreszenzindikators Fura-2 die lokale Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch folgende Formel berechnet werden:

55

Formel (4)  $[Ca^{2+}] = K_D \times [Fura-2-Ca^{2+}]/[Fura-2]$ .

#### Alternative Datenanalyseverfahren

60 Alternativ zum beschriebenen multivariaten linearen Regressionsverfahren wurden nichtlineare Regressionsverfahren geprüft. Die Berechnung der relativen Anteile der Einzelkomponenten zum Gesamtignal wird durch ein Minimierungsverfahren der Abweichungsquadrate zwischen Meßwerten der Probe und einer Summierung der mit den gesuchten Faktoren multiplizierten normierten Meßdaten der Reinformen (Formel (1)) erzielt. Die Summe der Abweichungsquadrate kann mittels verschiedener iterativer Verfahren minimiert werden. Vergleichend wurden die "steepest gradient" Methode und der Levenberg-Marquardt-Algorithmus für die iterative Berechnung angewendet. Beide Verfahren ergeben unter Berücksichtigung äquivalenter Abbruchkriterien der iterativen Optimierung identische Lösungen. Bei geeigneter Wahl von Startwerten für die iterativ zu ermittelnden Faktoren  $b_1 \dots b_m$  ist das nichtlineare Regressionsverfahren zuverlässig und bietet eine einfache Handhabung. Falls die Startwerte und die initialen Schrittweiten des iterativen Verfahrens ungünstig definiert wurden, ergeben sich jedoch falsch konditionierte Iterationsschritte, die eine Fehlbestimmung in Form eines lokalen Minimums der Minimierungsfunktion ergeben können. Diese Gefahr kann zwar durch die Definition von Grenz-

werten für  $b_1 \dots b_m$  reduziert werden, doch gerade bei Minimierungsfunktionen mit komplexer Topologie ist die Zuverlässigkeit der iterativen Suche des globalen Minimums eingeschränkt.

Das multivariate lineare Regressionsverfahren bietet somit gegenüber dem nichtlinearen Regressionsverfahren für die Mehrzahl der Applikationen folgende Vorteile:

- nichtlineare Regressionsverfahren bergen das Risiko, ein lokales Optimum der Datenanpassung zu finden, das multivariate lineare Regressionsverfahren erfaßt immer das globale Optimum der Datenanpassung.
- Der Berechnungsaufwand durch das multivariate lineare Verfahren ist wesentlich niedriger als bei den iterativen Verfahren und bei einer gegebenen Konfiguration immer identisch. Somit ist die benötigte Rechenzeit abschätzbar und dadurch die Integrierbarkeit in Echtzeit-Programmabläufe gegeben.
- Die Berechnungsschritte der Matrixoperation (Formel (3)) bestehen lediglich in Additionen und Multiplikationen. Daher kann für die Anwendung des Verfahrens der hohe Grad der Rechenoptimierung in aktuellen Prozessoren ("pipelining" von Additionen und Multiplikationen) ideal genutzt werden. Alternativ können jedoch auch Prozessoren mit reduziertem Beschlissatz ("RISC"-Prozessoren) verwendet werden.

5

10

15

### Anwendungsbeispiel

Die Vorrichtung, die bei Erstellung des Anwendungsbeispiels verwendet wurde, ist in Zeichnung 1 schematisch wiedergegeben. Das in einem Monochromator (T.I.L.L.-Photonics) erzeugte Anregungslicht wurde durch eine schnelle Steuervorrichtung auf verschiedene Wellenlängen eingestellt. Durch die Wahl der Ruheposition des Monochromators bei einer von der Optik nicht transmittierten Wellenlänge von 260 nm diente die schnelle Monochromatorsteuerung gleichzeitig zur Steuerung der Belichtungszeit der CCD-Kamera. Andernfalls muß durch eine gepulste Lichtquelle oder durch einen mechanischen oder elektronischen Verschluß im Strahlengang die Belichtungszeit des Sensors reguliert werden. Das Anregungslicht kann bei Verwendung nicht-monochromer Lichtquellen durch geeignete Bandpassfilter gefiltert werden. Hier können zur Aufzeichnung spektraler Datensätze beispielsweise Filterräder zum Einsatz kommen, die synchron zu dem Verschluß der CCD-Kamera gesteuert werden. Die dichroischen Spiegel, die bei herkömmlichen Epifluoreszenzmikroskopen verwendet werden, können ebenfalls zur spektralen Auf trennung gewechselt werden. Hierbei ist jedoch auf einen möglichen Pixelversatz des Bildsignals nach Wechsel der Spiegel und Filtersätze zu achten, der durch die Bauweise der Spiegel und Filter bedingt sein kann. Das Objektiv muß über eine hinreichende Bildebnung und eine geringe chromatische Aberration verfügen. Das im Anwendungsbeispiel angewendete Objektiv ist ein UV-optimierter, lichtstarker Achromat (Fluar 10x/0.50, Carl Zeiss AG), dessen Bildebnung im Meßfeld der verwendeten CCD-Kamera eine hohe Bildschärfe in den verwendeten spektralen Bereichen erzeugt. Das emittierte Licht wurde zur Elimination von Streulicht durch einen Langpassfilter (Transmission bei  $\lambda > 510$  nm) geleitet, bevor es in den Sensor gelangte. Die verwendete CCD-Kamera zeichnet sich durch einen "grade-0"-Chip ohne Pixeldefekte aus, der zur Verringerung des Dunkelstromes durch Peltier-Elemente auf -20°C gekühlt wird. Bei Verwendung anderer Sensoren muß beachtet werden, daß das Regressionsverfahren auf der Grundlage der Formel (1) nur dann angewendet werden kann, wenn der Sensor in einem linearen Arbeitsbereich betrieben wird. Gegebenenfalls können bei einem bekanntem, nichtlinearen Verhalten des Sensors entsprechende Umrechnungsfaktoren bei der Datenerfassung angewendet werden, um die tatsächliche Signalintensität der Probe zu erfassen und nach den beschriebenen Verfahren fortzusetzen.

20

25

30

35

40

45

In Fig. 2 sind spektral aufgelöste Datensätze der Anregungswellenlängen von 320 nm bis 490 nm in 1 nm-Schritten von Fura-2, Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex und "green fluorescent protein" (GFP) nach Normierung auf die maximale Fluoreszenzintensität des entsprechenden Fluorochroms abgebildet. Als Reinformen wurden in der Fokusebene folgende Materialien gemessen:

1. GFP: In HEK 293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen), die rekombinantes modifiziertes GFP exprimieren (48 Stunden nach transakter Transfektion des Plasmids pEGFP-C1, Clontech, Palo-Alto, CA, USA).
2. Fura-2: In HEK 293-Zellen, die mit Fura-2-Azetoxymethylester (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) geladen wurden, und mit dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure 2 mM (EGTA; Fluka, Deisenhofen, Deutschland) und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin 5 μM (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 2 h inkubiert wurden.
3. Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex: In HEK 293-Zellen, die mit Fura-2-Azetoxymethylester (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) geladen wurden und mit Ca<sup>2+</sup> 10 mM und dem Ca<sup>2+</sup>-Ionophor Ionomycin 5 μM (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) für 20 min inkubiert wurden.
4. Zusätzlich zu Punkt 2 und 3 wurde eine 2 μM Lösung von Fura-2-Kaliumsalz in einer Pufferlösung (pH 7,1) in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> bzw. EGTA in der Probenkammer gemessen. Die Daten dieser Messungen ergaben gegenüber den Messungen nach Punkt 2 und Punkt 3 weniger als 1 nm spektrale Verschiebungen und bestätigten dadurch die Effizienz der Aquilibriationsprozedur in HEK 293-Zellen. Da diese normierten Anregungsspektren mit den nach Punkt 2 bzw. Punkt 3 ermittelten Spektren nahezu übereinstimmen, wurden sie aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in Zeichnung 2 abgebildet.

50

55

60

Als Probe wurden im selben optischen System HEK 293-Zellen gemessen, die gleichzeitig mit pEGFP-C1 und der cDNA eines Kationenkanals (mTRPC4) im Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen, USA) transient transfiziert wurden. Die Kontrolle der Transfektionsfizienz und die Auswahl der positiv transfizierten Zellen für den Meßvorgang konnte durch die Expression des GFP erfolgen. Der Ca<sup>2+</sup>-Indikator Fura-2 wurde verwendet, da er Mangan (Mn<sup>2+</sup>) unter Ausbildung eines nicht-fluoreszierenden Komplex bindet (Grynkiewicz et al. (1985)). Da der Kationenkanal mTRPC4 neben Ca<sup>2+</sup> auch Manganionen (Mn<sup>2+</sup>) leitet, kann in Mn<sup>2+</sup>-haltigen Medien die Kanalaktivität durch das Absinken der Fura-2- und Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Fluoreszenz verfolgt werden. Hierbei wäre zu erwarten, daß die Fluoreszenz beider

65

# DE 199 15 137 A 1

Fura-2-Indikator spezies absinkt, nicht jedoch die Fluoreszenz des GFP. Da große Intensitätsunterschiede der Fluoreszenzen der drei in der Probe vorhandenen Fluoreszenzfarbstoffspezies im Bereich von 340 nm, 358 nm, 380 nm und 480 nm große Differenzen untereinander aufweisen, wurden diese Anregungswellenlängen für den Meßvorgang ausgewählt. Durch die Wahl der Expositionszeit der CCD-Kamera von 30 ms bei jeder Anregungswellenlänge wurde der dynamische Bereich der CCD-Kamera optimal genutzt, wobei insbesondere darauf geachtet wurde, daß keine Bildpixel die Sättigungsschwelle der CCD-Kamera übersteigen. Die Aufzeichnung eines spektralen Datensatzes erforderte weniger als 200 ms und wurde in 1 s Intervallen wiederholt.

Bildregionen, die einzelnen Zellen entsprechen, wurden selektiert und eine Zeitserie der mittleren Bildpixelwerte über jede der selektierten Bildregionen berechnet. Die entsprechenden Mittelwerte der Bildregionen bei den Wellenlängen 340 nm, 358 nm, 380 nm und 480 nm sind als Funktion der Zeit in den Fig. 3-6 dargestellt. Bei 20 s wurde  $Mn^{2+}$  1 mM zugegeben, um die Kanalaktivität zu verfolgen, nach 90 s wurden die Zellen mit Carbachol 100  $\mu M$  stimuliert. Durch das beschriebene multivariate, lineare Regressionsverfahren wurden nun die relativen Beträge der einzelnen Fluorochrome, die sich zum jeweiligen Gesamt signal addieren, für jede Zelle zu den verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Zugrundegelegt wurden hierbei die normierten spektral aufgetrennten Fluoreszenzintensitäten der Reinformen aus Fig. 2. Nach Verrechnung der relativen Fura-2 und Fura-2-Ca<sup>2+</sup> Konzentrationen gemäß der Formel (4) wurde die resultierende freie zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in den selektierten Bildarealen (entsprechend mehreren verschiedenen Zellen im Gesichtsfeld) im oberen Abbildungsteil der Fig. 7 ((1) in Fig. 7) als Funktion der Zeit aufgetragen. Die durch das multivariaten, linearen Regressionsverfahren ermittelten Zeitverläufe der Summe der relativen Fura-2 und Fura-2-Ca<sup>2+</sup> Fluoreszenzen wurden summiert und nach Normierung auf die initialen Fluoreszenzintensitäten im mittleren Abbildungsteil der Fig. 7 ((2) in Fig. 7) dargestellt. Die relative GFP-Konzentration ist im unteren Abbildungsteil der Fig. 7 ((3) in Fig. 7) aufgetragen. Aus Abbildungsteil (2) in Fig. 7 kann man ersehen, daß die Stimulation eines Mn<sup>2+</sup>-Einstromes zu einer rapiden Verringerung der Fura-2- und Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Signale führt. Die durch das genannte Verfahren ermittelte GFP-Fluoreszenz ((3) in Fig. 7) hingegen bleibt nahezu konstant. Weiterhin ist eine Bestimmung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration selbst unter mehreren Störereinflüssen möglich ((1) in Fig. 7). So wurden im Anwendungsbeispiel mehrere Störgrößen eingeführt, die jeweils eine Quantifizierung durch das von Grynkiewicz et al. (1985) beschriebene "Ratio-Verfahren" beeinträchtigen würden:

- Die Anwesenheit eines dritten Fluorochroms (GFP) verursacht in den Anregungswellenlängen 380 nm, 358 nm und 340 nm unterschiedlich starke Signalintensitäten, die die Fluoreszenzsignale von Fura-2 überlagern.
  - Die deutliche Abnahme der Fura-Fluoreszenzen nach Auslösung eines Mn<sup>2+</sup>-Einstromes in die Zellen führt zu inkonsistenten Ergebnissen nach dem "Ratio-Verfahren".
  - Durch Abnahme der Fura-Fluoreszenzen nimmt die Störgröße der GFP-Fluoreszenz zeitabhängig im Verhältnis zu den Fura-Fluoreszenzen zu.
- Da mit dem in dieser Erfindung beschriebenen Verfahren die Fluorochromzusammensetzung ohne die Bildung von "Ratio-Verfahren" ermittelt werden kann, nehmen die Störgrößen keinen Einfluß auf die Quantifizierung der örtlich und zeitlich aufgelösten Fluorochromzusammensetzung. Fluorochrome mit deutlich überlappenden spektralen Eigenschaften können somit erstmals ohne die Verwendung von "Ratio-Verfahren" zuverlässig quantifiziert werden.

## Beispiele der bevorzugten Nutzungsmöglichkeiten der Erfindung

Die Schnelligkeit des Berechnungsverfahrens erlaubt es, eine hohe zeitliche und/oder räumliche Auflösung der Meßvorrichtung unvermindert zu nutzen. Durch weitere Entwicklungen in Hard- und Software werden durch online-Berechnungen die im Speicher verbleibenden Datensätze weiter reduziert werden können, da nach dem Berechnungsverfahren die spektral aufgelösten Bilddaten nicht mehr benötigt werden. Eine online-Berechnung der Datensätze würde neben der Speicherplatzreduktion den weiteren Vorteil bieten, daß bereits kalibrierte Daten visualisiert werden können. Der Anwender könnte auf dem Bildschirm beispielsweise simultan und nahezu in Echtzeit die bereits kalibrierte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration, den pH-Wert in einer Zelle oder die Lokalisation verschieden fluoreszierender Proteine und Farbstoffe während eines laufenden Experiments beobachten. In einem Fluoreszenzmikroskop können nach Angabe der in der Probe enthaltenen Fluorochrome durch Echtzeit-Berechnungen verschiedene Fluorochrome in getrennten Bildern oder durch Farbkodierungen kenntlich gemacht nebeneinander oder in übereinander gelagerten Bildern dargestellt werden. Dies ist bei Verwendungen von Fluorochromen, die durch optische Vorrichtungen quantitativ unterscheidbar sind, in der konfokalen Lasermikroskopie und in der mehr-Phoronen-Mikroskopie bereits verwirklicht worden. Bei Verwendung von Indikatorfarbstoffen können jedoch lediglich relative Veränderungen beobachtet werden; eine Quantifizierung könnte mit dem in dieser Erfindung beschriebenen Verfahren ermöglicht werden.

Vorrichtungen, die durch ihre Eignung zur Aufzeichnung spektraler Datensätze für die Anwendungen des in dieser Erfindung beschriebenen Verfahrens besonders geeignet erscheinen, sind beschrieben worden. Sie umfassen konfokale und nicht-konfokale Fluoreszenzmikroskope (US 5751417, US 5861984, US 5864139, WO 9222793), aber auch die Fluoreszenz-gestützte Durchflußzytometrie (in Patent US 4745285 bereits mit den technischen Voraussetzungen für eine spektrale Auftrennung der Fluoreszenzemission beschrieben) oder die Fluoreszenz-basierende DNA-Sequenzierung (EP 0294524 und dessen Weiterentwicklungen). Die Kalibration der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Mikroskopie (z. B. WO 9855026) kann ebenfalls durch das erfindungsgemäße Verfahren bedeutend erleichtert werden. Die Fluoreszenzen des "green fluorescent protein" (GFP) und seiner Varianten (US 5777079, WO 9821355, EP 0851874, US 5741668, WO 9742320, CA 2232727, WO 9726333, AU 4482996, US 55625048, WO 9711094, WO 9623810, WO 9521191) können mit dem erfindungsgemäßen spektroskopischen Quantifizierungsverfahren trotz überlappender spektraler Eigenschaften effektiv voneinander separiert werden. Dies ermöglicht erstmals die simultane Bestimmung vieler Expressionsmarker in vitalen Zellen. Durch die Expression von Fusionsproteinen mit den genannten GFP-Varianten können verschiedene zelluläre Proteine simultan in lebenden Zellen beobachtet werden. Kolokalisationsstudien

# DE 199 15 137 A 1

mit Hilfe der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Methode (FRET) können mit dem in dieser Erfindung vorgestellten Verfahren durch die exakte Quantifizierung der Einzelfluoreszenzen mit bedeutend größerem Auflösungsvermögen durchgeführt werden.

Literaturnachweis:

1. Brismar H., Ulthake B., *Fluorescence lifetime measurements in confocal microscopy of neurons labeled with multiple Fluorophores*; Nat. Biotechnol. 1997; 15: 373–377; 5
2. Carlsson K., Aslund N., Mossberg K., Philip J., *Simultaneous confocal recording of multiple fluorescent labels with improved channel separation*; J. Microsc. 1994; 176: 287–299;
3. Carlsson K., Liljeborg A., *Simultaneous confocal lifetime imaging of multiple fluorophores using the intensity-modulated multiple-wavelength scanning (IMS) technique*; J. Microsc. 1998; 191: 119–127; 10
4. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y., *A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties*; J. Biol. Chem. 1985; 260: 3440–3450;
5. He H., Nunnally B. K., Li L. C., McGown L. B., *On-the-fly fluorescence lifetime detection of dye-labeled DNA primers for multiplex analysis*; Anal Chem. 1998; 70: 3413–3418;
6. Lowy R. J., *Evaluation of triple-band filters for quantitative epifluorescence microscopy*; J. Microsc. 1995; 178: 240–250; 15
7. Oida T., Sako Y., Kusumi A., *Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells*; Biophys. J. 1993; 64: 676–685;
8. Ried T., Baldini A., Rand T. C., Ward D. C., *Simultaneous visualization of seven different DNA probes by in situ hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy*; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1992; 20 89: 1388–1392.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Quantifizierung mehrerer Fluorochrome, bei dem durch Aufzeichnung und Speicherung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen der in einer Probe enthaltenen Fluorochrome in Reinform, durch die Aufzeichnung und Speicherung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen der Probe und durch die Anwendung eines multivariaten, linearen Regressionsverfahrens die Beiträge der Reinformen zu komplexen Gesamt signalen ermittelt werden, dadurch gekennzeichnet, dass eine spektrale Auftrennung durch die Verwendung verschiedener Anregungswellenlängen erfolgt. 25
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine spektrale Auftrennung oder Filterung des emittierten Lichtes bei einer Anregungswellenlänge zur Erfassung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen eingesetzt wird. 30
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine spektrale Auftrennung oder Filterung des emittierten Lichtes bei mehreren verschiedenen Anregungswellenlängen zur Erfassung spektral aufgetrennter Fluoreszenzen eingesetzt wird. 35
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein nichtlineares Regressionsverfahren zur Berechnung der Beiträge der Reinformen zu komplexen Gesamt signalen verwendet wird. 40
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß bei Verwendung von m verschiedenen Fluorochromen n = m verschiedene spektrale Konfigurationen zur Datenaufzeichnung eingesetzt werden, und ein Substitutionsverfahren zur Berechnung der Beiträge der Reinformen zu komplexen Gesamt signalen verwendet wird. 45
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Anregungslichtquellen kontinuierliche oder gepulste Laserlichtquellen verwendet werden. 50
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Quantifizierungen von Milieu bedingungen durchgeführt werden, wobei ein oder mehrere Fluoreszenzindikator(en) eingesetzt werden, deren milieuabhängig veränderliche Formen für das erfundungsgemäße Quantifizierungsverfahren als verschiedene Reinformen von Fluorochromen behandelt werden können. 55
8. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Fluoreszenzmikroskopie.
9. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1, 2, 3, 4 und 6 in der Nukleinsäuresequenzierung.
10. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Durchflußzytometrie oder dem "fluorescence-assisted-cell-sorting" (FACS).
11. Anwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7 in der Fluoreszenzspektrophotometrie oder der Fluoreszenz korrelationsspektroskopie.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

55

60

65

Fig. 1:  
Flußdiagramm der notwendigen  
Arbeitsschritte zur Durchführung des  
erfindungsgemäßen Verfahrens

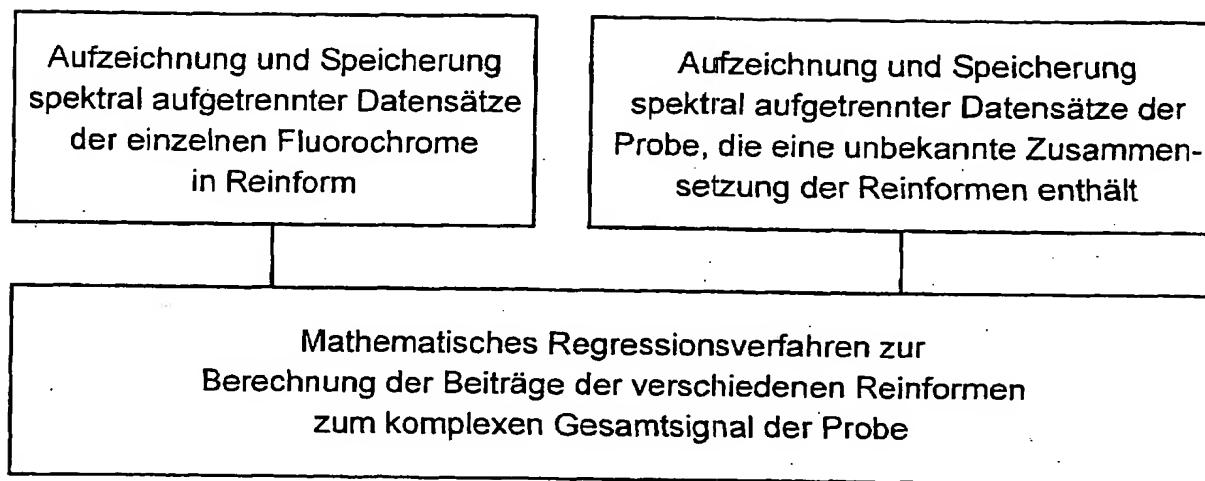


Fig. 2:  
Anregungsspektren der Fluoreszenzen  
von Fura-2, Fura-2-Ca<sup>2+</sup>-Komplex und  
GFP ("green fluorescent protein")

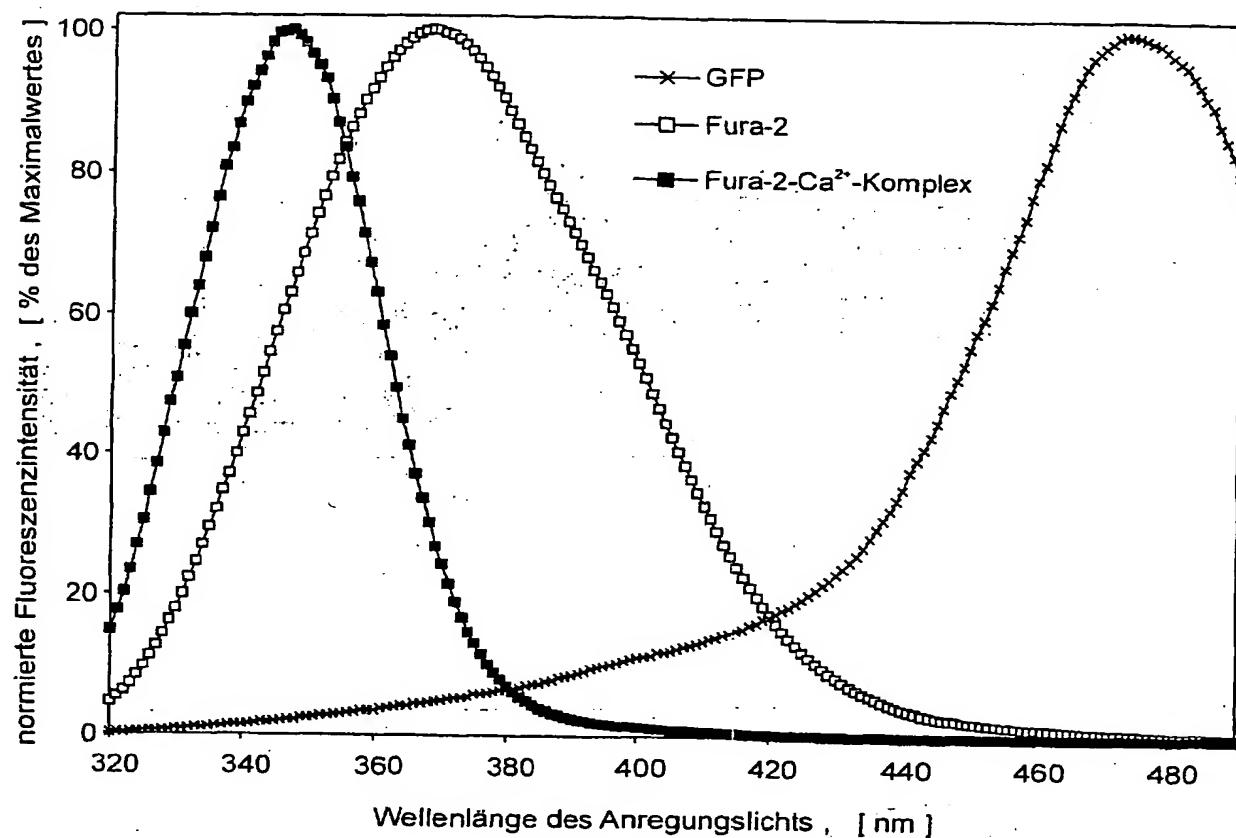


Fig. 3

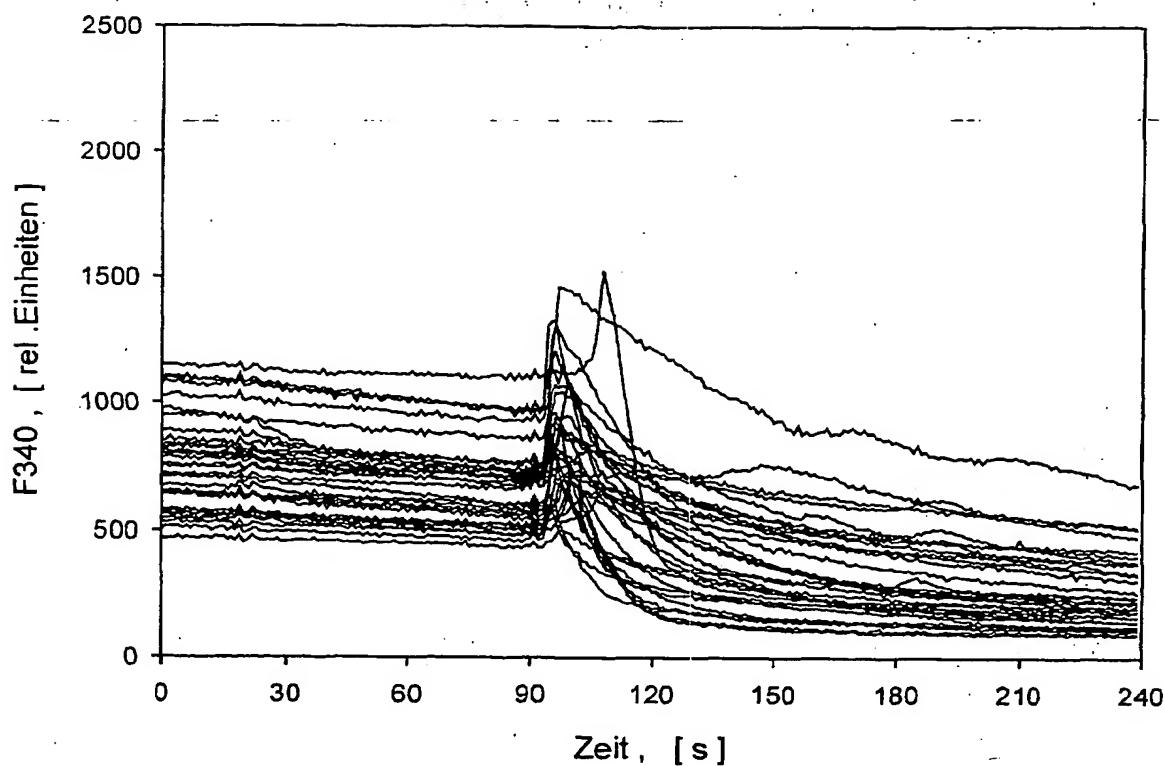


Fig. 4

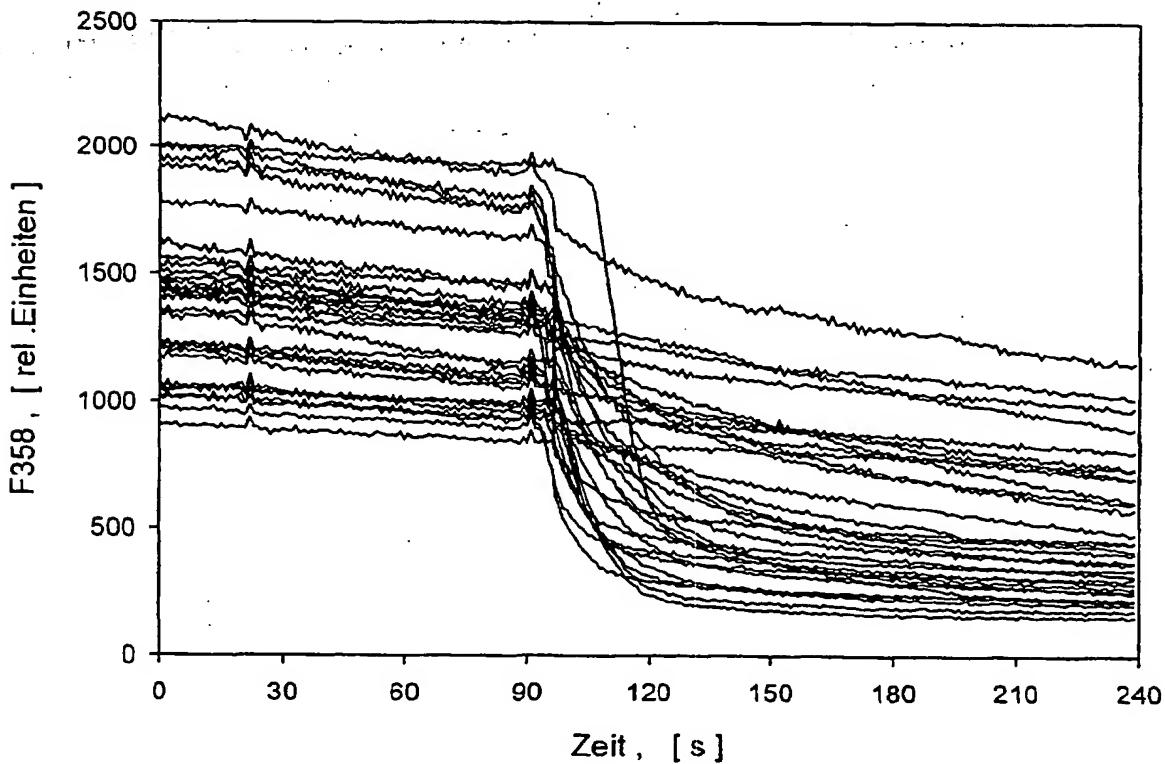


Fig. 5

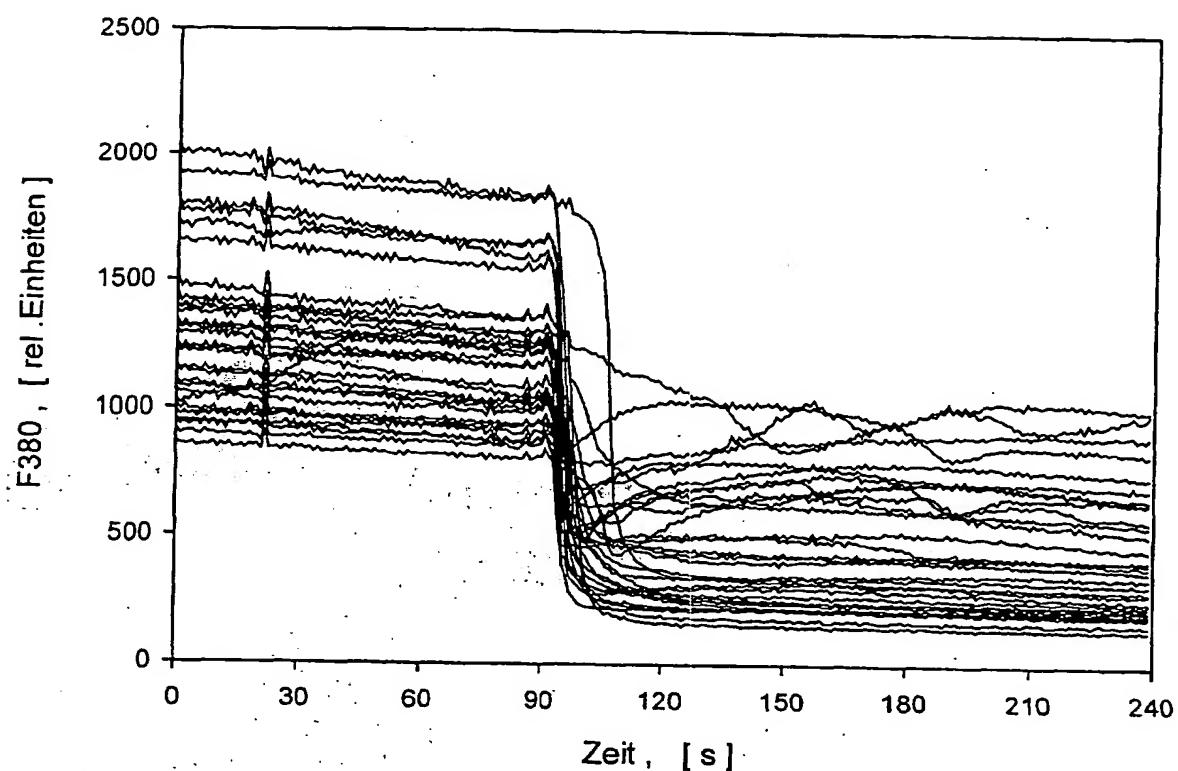


Fig. 6

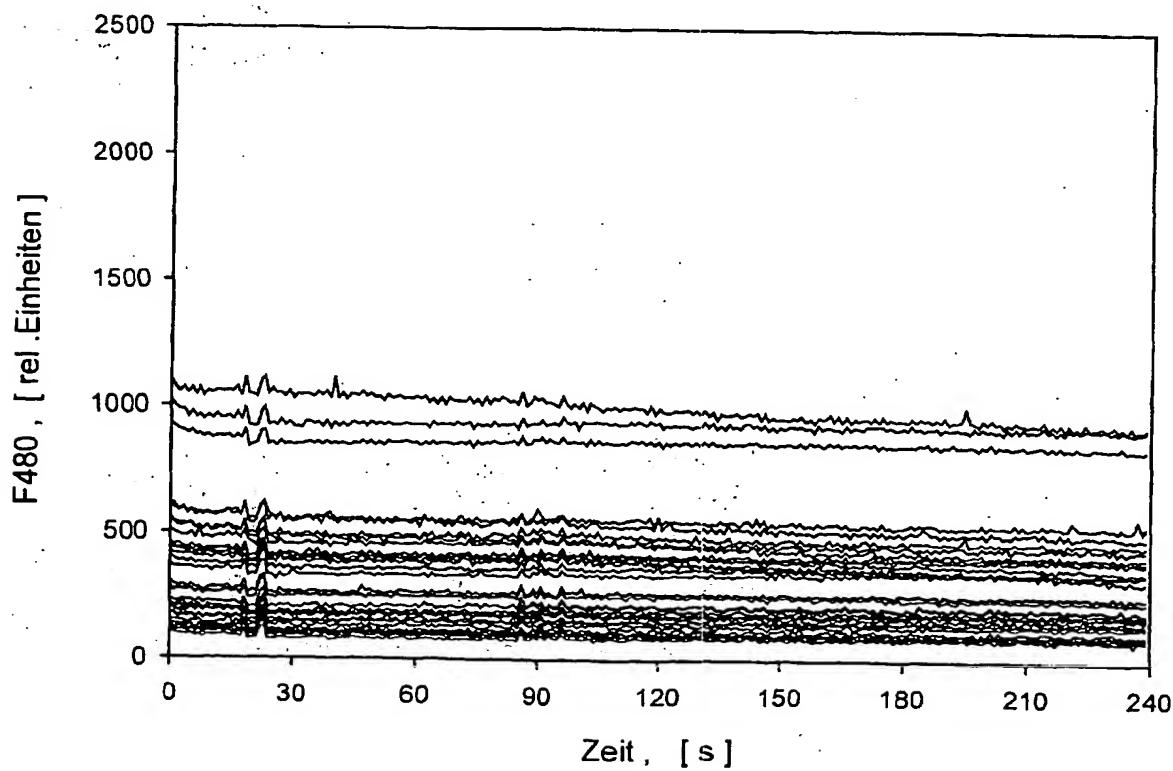


Fig. 7

